





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی شهید بهشتی دانشکده

پزشکی

پایان نامه جهت دریافت مدرک

کارشناسی ارشد ایمونولوژی

بررسی سطح سرمی و پلی مورفیسمهای ناحیه پروموتور ژن TGF- β 1 در

بیماران پره اکلامپسی و مقایسه آن با گروه کنترل

استاد راهنما:

آقای دکتر داور امانی

استاد مشاور:

خانم دکتر ربابه طاهری پناه

نگارش:

صادق فیض اله زاده

۱۳۸۷/۵/۷

تقدیم به:

پدر و مادر و همسر عزیزم

که احساس عشق و محبت و خوشبختی
از جانب وجود آنهاست

خواهر و برادران دلبندم که در دوران تحصیل یاور و مشوقم بودند

خانواده گرامی همسرم که همواره قرین لطف و محبتشان هستم

با تقدیر و تقدیم به:
اساتید محترم دیارتمان ایمنولوژی دانشکده پزشکی
دانشگاه شهید بهشتی

جناب آقای دکتر پرویز پاکزاد که افتخار شاگردی ایشان را داشتم

جناب آقای دکتر داور امانی که با کمک و راهنمایی ایشان تمام مسیر های سخت آسان گشت

خانم دکتر ربابه طاهری پناه که زحمات بی شائبه ای در طول تحقیق متحمل شدند

خانم دکتر نریمان مصفا که از درس علم و اخلاق ایشان مستفید بودیم

خانم دکتر ماندانا ستاری که در طول تحصیل از هیچ کمک و راهنمایی دریغ نکردند

خانم دکتر فروزان کریمی که نکات مهمی را در علم و پژوهش از ایشان آموختم

آقای بابک فرخی
خانم شیده مهر مفخم
خانم فرزانه لبیبی
آقای حسن دربندی
خانم عظیم السادات جبلی

چکیده

پره اکلامپسی (**Pre-eclampsia(PE)** از بیماریهای دوران بارداری است که با افزایش فشار خون و دفع پروتئین از ادرار **همراه بوده و** باعث مرگ و میر مادر و جنین می شود. فرضیه رایج در مورد اتیولوژی پره اکلامپسی روی عدم تعادل پاسخهای ایمنی مادر و بهم خوردن تعادل Th1/Th2 و تهاجم ناقص تروفوبلاستها متمرکز است. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) یک سیتوکین چندکاره است که بوسیله اکثر لکوسیتها از جمله سلولهای Treg (Regulatory) ترشح می شود و نقش مهمی را در فیزیولوژی بارداری ایفا می کند. بسیاری از اعمال بیولوژیکی TGF- β 1 به شیوه اتوکرین یا پاراکرین اعمال می شود. دخالت TGF- β 1 در تنظیم پاسخهای ایمنی و فشار خون و نقش آن در اختلال عملکرد کلیه مطابق با اتیوپاتولوژی پره اکلامپسی است.

در این پایان نامه سطح سرمی و پلی مورفیسمهای **ناحیه** پروموتور ژن TGF- β 1 در **جایگاههای** 800G→A و 509C→T در ۱۴۲ بیمار مبتلا به پره اکلامپسی و ۱۲۹ **فرد سالم (نرمال) بعنوان کنترل به ترتیب با روش** Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) و Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment **Length Polymorphism (RFLP) بررسی** شد.

پلی مورفیسم ناحیه 800G→A: در این ناحیه ۷۳/۹٪ (۱۰۵ نفر) از بیماران، ۷۰/۵٪ (۹۱ نفر) از گروه کنترل (باردار و غیر باردار)، ۷۰/۹٪ (۳۹ نفر) از کنترل باردار و ۷۰/۳٪ (۵۲ نفر) از گروه کنترل غیرباردار هموزیگوت GG بودند. بعلاوه ۲۱/۱٪ (۳۰ نفر) از بیماران، ۲۸/۷٪ (۳۷ نفر) از گروه کنترل (باردار و *****(**تمامی اعداد همانند بالا رنگ قرمز** **اصلاح شود**) غیر باردار)، ۲۹/۱٪ (۱۶ نفر) از کنترل باردار و ۲۸/۴٪ (۲۱ نفر) از گروه کنترل

غیرباردار هتروزیگوت GA بودند. و ۴.۹٪ از بیماران و یک نفر از کنترل غیرباردار هموزیگوت AA بودند. بررسی آماری نشان می دهد که در جایگاه 800(G→A)- فراوانی ژنوتیپ ها و آللهای مختلف در بین بیماران PE و گروه کنترل اختلاف معنی دار نشان نمی دهند. ژنوتیپ AA در بیماران پره اکلامپسی به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود بود.

پلی مورفیسم ناحیه 509 C→T: در این ناحیه ۲۸.۲٪ (۴۰ نفر) از بیماران، ۲۴.۸٪ (۳۲ نفر) از گروه کنترل (باردار و غیر باردار)، ۱۴.۵٪ (۸ نفر) از کنترل باردار و ۳۲.۴٪ (۲۴ نفر) از گروه کنترل غیرباردار هموزیگوت CC بودند. بعلاوه ۴۱.۵٪ (۵۹ نفر) از بیماران، ۴۴.۲٪ (۵۷ نفر) از گروه کنترل (باردار و غیر باردار)، ۵۴.۵٪ (۳۰ نفر) از کنترل باردار و ۳۶.۵٪ (۲۷ نفر) از گروه کنترل غیرباردار هتروزیگوت CT بودند. و همچنین ۳۰.۳٪ (۴۳ نفر) از بیماران، ۳۱٪ (۴۰ نفر) از گروه کنترل (باردار و غیر باردار)، ۳۰.۹٪ (۱۷ نفر) از کنترل باردار و ۳۱.۱٪ (۲۳ نفر) از گروه کنترل غیرباردار هموزیگوت TT بودند. آنالیز آماری نتایج در پلی مورفیسم ناحیه 509 C→T- اختلاف معنی داری در بین گروههای بیمار و کنترل نشان نداد. ولی ژنوتیپ CC در بیماران پره اکلامپسی بیشتر از گروه کنترل بود(P).

میانگین سطح سرمی TGF-β1 در گروههای مورد بررسی بصورت زیر بود: بیماران پره اکلامپسی 119.05 ng/ml، گروه کنترل (باردار و غیر باردار) 112.9 ng/ml، گروه کنترل باردار 89.89 ng/ml و گروه کنترل غیر باردار 119.01 ng/ml بود.

میانگین سطح سرمی TGF-β1 بین بیماران پره اکلامپسی و گروه کنترل (باردار و غیر باردار) و بین دو گروه کنترل باردار و غیر باردار از نظر آماری اختلاف معنی داری نشان داد ($P<0.01$). در حالیکه بین بیماران پره اکلامپسی و گروه کنترل غیر باردار اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P>0.05$).

در این مطالعه بین توزیع ژنوتیپ ها و آللهای مختلف پلی مورفیسمهای ناحیه پروموتور $TGF-\beta 1$ با بیماری پره اکلامپسی ارتباطی بدست نیامد اما ژنوتیپ AA^- در ناحیه - 800(G \rightarrow A) و ژنوتیپ CC در ناحیه -509 C \rightarrow T در بیماران پره اکلامپسی بیشتر از گروه کنترل بود. سطح سرمی $TGF-\beta 1$ در بیماران پره اکلامپسی نسبت به گروه کنترل بالاتر بود. بنابراین سطح سرمی این سایتو کاین می تواند در اتیوپاتولوژی پره اکلامپسی دخالت داشته باشد.

Abstract

Preeclampsia (PE) is pregnancy associated disorder with hypertension and proteinuria that cause neonatal and maternal morbidity and mortality. The current hypothesis regarding the etiology of PE is focused on maladaptation of immune responses, Th1/Th2 disequilibrium and defective trophoblast invasion. Transforming growth factor- $\beta 1$ ($TGF-\beta 1$) is multifunctional cytokine that secreted by T regulatory lymphocyte (Treg) and play an important role in the physiology of pregnancy. Much of $TGF-\beta 1$ biological actions are mediated in an autocrine or paracrine manner. Involvement of $TGF-\beta 1$ in immunoregulation, hypertension and renal dysfunction make it a key cytokine in etiopathology of PE. In this investigation serum levels and promoter region polymorphisms of $TGF-\beta 1$ gene (positions -800 G \rightarrow A and -509 C \rightarrow T) were studied in 142 PE and 129 Normal control female subjects by Enzyme Linked

Immunosorbent Assay (ELISA) and PCR-RFLP methods respectively. At position -800 G→A; 73.9% of PE cases, 70.5% normal control, 70.9% of pregnant and 70.3% of nonpregnant control group were homozygote GG. In addition, 21.1% of cases, 28.7% of normal control, 29.1% of pregnant and 28.4% of nonpregnant control group were heterozygote GA, 4.93% of PE cases and only one of the normal controls was homozygote AA. The results indicated that there are no statistically significant differences of genotype distribution and allele frequencies between PE cases and normal controls at position -800 G→A polymorphism but AA genotype showed higher frequency in PE patients in comparison with control group(P).

In the case of -509 C→T Polymorphisms; 28.2% of patients, 24.8% of normal controls, 14.5% of pregnant and 32.4% of nonpregnant control group were homozygote CC. While 41.5% of cases and 44.2% of normal controls, 54.5% of pregnant and 36.5% of nonpregnant control group were heterozygote CT. 30.3% of PE and 31% of normal controls, 30.9% of pregnant and 31.1% of nonpregnant control group were homozygote TT. Statistical analysis showed no significant differences of genotype distribution and allele frequencies between PE cases and normal controls at this position ;but CC genotype significantly were higher in PE patients.

TGF-β1 serum levels in studied groups were: PE patients 119.05, control (pregnant & nonpregnant) 112.9, control pregnant 89.89 and control nonpregnant 119.01 ng/ml. The serum level of TGF-β1 were significantly different between PE patients , normal pregnant control group ($p<0.01$) and also between pregnant and nonpregnant control group ($p<0.01$) . While difference between PE and nonpregnant control group was insignificant ($p>0.05$). The results of this investigation indicate that there are no statistically significant differences of genotype distribution and allele frequencies between PE cases and normal controls at promoter region polymorphisms of TGF-β1. But AA genotype at position -800 G→A and CC genotype at position -509 C→T had higher frequency in PE patients. In conclusion, the promoter region polymorphisms of TGF-β1 at positions -800 (G→A) and -509 (C→T) may not be associated with PE . Serum levels of TGF-β1 were higher in PE patients and this cytokine may play key role in the etiopathology of PE. Further studies are needed to clarify this hypothesis.

فهرست مطالب

فصل اول:

مقدمه.....	۱-۴۸
(۱-۱) بیان مسئله.....	۲-۳
(۲-۱) اهداف و فرضیات	۴-۵
(۳-۱) بررسی متون.....	۵-۴۳
(۱-۳-۱) تعریف ایمنولوژی تولید مثل Reproductive Immunology ۵-۷.....	
(۲-۳-۱) سیستم ایمنی مادر در دوران بارداری.....	۷
(۳-۳-۱) حاملگی موفقیت آمیز یک پدیده Th2 است.....	۷-۸
(۴-۳-۱) الگوی Th1/Th2/Th3	۸-۹
(۵-۳-۱) سایتوکاین ها (Cytokines).....	۹-۱۰
(۶-۳-۱) سیتوکینها و شکست بارداری.....	۱۰
(۷-۳-۱) پره اکلامپسی.....	۱۰-۱۴
(۱-۷-۳-۱) اتیولوژی	۱۱-۱۳
(۲-۷-۳-۱) سیستم ایمنی در پره اکلامپسی	۱۳-۱۴
(۸-۳-۱) Transforming Growth factor- β (TGF- β) پاسخ ایمنی و تولید مثل.....	۱۴-۳۴
(۱-۸-۳-۱) تعریف	۱۴
(۲-۸-۳-۱) تاریخچه.....	۱۴-۱۵

۱۶-۱۸.....	۳-۸-۳-۱) ساختمان و نحوه تولید $TGF-\beta$
۱۸-۱۹.....	۴-۸-۳-۱) تبدیل $TGF-\beta$ به $L-TGF-\beta$ فعال از نظر بیولوژیکی
۱۹-۲۲.....	۵-۸-۳-۱) رسپتورهای $TGF-\beta$ و انتقال سیگنال
۲۲-۲۳.....	۶-۸-۳-۱) اثرات بیولوژیکی $TGF-\beta$
۲۳.....	۷-۸-۳-۱) تنظیم پاسخ ایمنی توسط $TGF-\beta$
۲۳-۲۴.....	۸-۸-۳-۱) تنظیم تکامل و عملکرد سلولهای T
۲۴-۲۵.....	۹-۸-۳-۱) نقش $TGF-\beta$ در نوع پاسخهای Th
۲۵-۲۶.....	۱۰-۸-۳-۱) اثرات $TGF-\beta$ بر روی تمایز Th1, Th2
۲۶-۲۸.....	۱۱-۸-۳-۱) کنترل عملکرد منوسیت / ماکروفاژ
۲۸-۲۹.....	۱۲-۸-۳-۱) نقش $TGF-\beta$ در القا تولرانس ایمنولوژیک
۲۹-۳۰.....	۱۳-۸-۳-۱) اثرات ایمونوساپرسیوی $TGF-\beta 1$
	۱۴-۸-۳-۱) تنظیم پاسخ ایمنی در فرایند تولید مثل و نقش $TGF-\beta$
۳۰-۳۲.....	β
	۱۵-۸-۳-۱) بیان خانواده $TGF-\beta$ و نقش آنها در لانه گزینی و تکامل جنین و
۳۲-۳۳.....	جفت
۳۳-۳۴.....	۱۶-۸-۳-۱) تولرانس پاسخ ایمنی مادر در برابر جنین
۳۴-۳۵.....	۹-۳-۱) اهمیت $TGF-\beta 1$ در ناراحتیهای کلیه
۳۶.....	۱۰-۳-۱) ارتباط فشار خون و $TGF-\beta 1$
۳۷.....	۱۱-۳-۱) اهمیت $TGF-\beta 1$ خون

۳۷-۳۸.....	۱-۱۱-۳-۱ سطح $TGF-\beta$ خون.....
۳۹.....	۲-۱۱-۳-۱ کنترل سطح $TGF-\beta_1$ خون.....
۳۹-۴۱.....	۱۲-۳-۱ نحوه اندازه گیری $TGF-\beta_1$
۴۱-۴۲.....	۱۳-۳-۱ کاربردهای پزشکی $TGF-\beta$
۴۲-۴۳.....	۱۴-۳-۱ ژنتیک ملکولی $TGF-\beta_1$
۴۴-۴۸.....	۴-۱ مروری بر پژوهشها.....
	فصل دوم
۴۹-۶۸.....	مواد وسایل و روشها.....
۵۰.....	۱-۲ دستگاههای.....
۵۱.....	۲- مواد شیمیایی.....
۵۲.....	۱-۲-۲ پرایمرهای.....
۵۲.....	۲-۲-۲ آنزیم های محدود کننده.....
۵۳.....	۳-۲ جمعیت مورد مطالعه.....
۵۳.....	۱-۳-۲ بیماران مبتلا به پره اکلامپسی.....
۵۳.....	۲-۳-۲ گروه کنترل.....
۵۳-۶۸.....	۴-۲ روشها Methods.....
۵۳-۵۵.....	۱-۴-۲ خون گیری و استخراج DNA.....
۵۵.....	۲-۴-۲ اندازه گیری غلظت DNA استخراج شده.....
۵۶.....	۳-۴-۲ روش PCR-RFLP.....
۵۷-۵۸.....	۱-۳-۴-۲ واکنش PCR.....
۵۸-۵۹.....	۲-۳-۴-۲ الکتروفورز محصول PCR در ژل آگاروز.....

Restriction روش (۳-۳-۴-۲)

۶۰-۶۲..... Fragment Length Polymorphism(RFLP)

۶۲-۶۸..... ELISA روش به TGF- β سرمی اندازه گیری سطح

۶۶-۶۸..... پروتکل تست (۳-۵-۲)

۶۸..... محاسبه نتایج (۴-۵-۲)

۶۸..... روشهای آماری (۶-۲)

فصل سوم

۶۹-۸۴..... نتایج

۷۰..... TGF- β 1 تعیین پلی مورفیسم های پروموتور ژن (۱-۳)

۷۰-۷۶..... -800 G \rightarrow A جایگاه پلی مورفیسم (۱-۱-۳)

۷۶-۸۱..... -509 C \rightarrow T جایگاه پلی مورفیسم (۲-۱-۳)

۸۱-۸۴..... TGF- β 1 اندازه گیری سطح سرمی (۲-۳)

فصل چهارم

۸۶-۹۰..... بحث و نتیجه گیری

۸۶-۹۰..... بحث

۹۰..... نتیجه گیری

فصل پنجم

۹۱-۱۱۱..... رفرانسها